第 41 卷 第 3 期　　昆 虫 学 报　　Vol. 41, No. 3
1998 年 8 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Aug., 1998

用低 G/C %含量引物通过 PCR 扩增家蝇细胞色素 P-450 cDNA

康巧华* 陈年春
（中国农业大学应用化学系，北京 100094）
周顺伍 齐顺章
（中国农业大学生物学院，北京 100094）

摘要 根据昆虫细胞色素 P-450基因的多型性和遗传多态性，以苯巴比妥钠诱导、室内饲养的杀虫剂敏感种群雌性家蝇 *Musca domestica vicina* Macquart 为材料，提取总 RNA，以 Oligo（dT）-纤维素亲和层析分离出总 mRNA；以此为模板反转录合成总 cDNA。再以总 cDNA 为模板，以 P-450 *CYP6A1* cDNA 序列为参考设计一对低 G/C%含量引物，进行 PCR 扩增，获得1.5kb 左右的预期目的片段。

关键词 家蝇，细胞色素 P-450，cDNA，PCR，遗传多态性

细胞色素 P-450在生物体内代谢内、外源物质过程中起着极其重要作用。P-450一直是药理学和毒理学中一个十分引人注目的研究领域。越来越多的证据还表明 P-450与高等动物的肿瘤发生密切相关，由此极大地推进了对其在分子（基因）水平的研究[1~2]。大量研究表明：P-450在农业害虫抗药性中起着十分重要作用。由于它的多型性和对底物的广谱性，不仅能降解在使用的药剂，而且能降解那些尚未合成或从未使用过的药剂，由此导致交互抗性的产生[3~4]。近年来，P-450分子生物学研究日益受到重视，已有大量的 P-450 cDNA 基因被克隆测序[5]。为探索害虫抗药性的分子机理和为治理抗性提供理论指导及合理利用昆虫抗药性基因，昆虫 P-450分子水平研究也十分深入。自 Synder 等（1983）首次分离黄猩猩果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen 一种 P-450 cDNA 基因以来，至今已有果蝇、家蝇 *Musca domestica* L.、蜚蠊 *Blaberus discoidalis*、北美黑凤蝶 *Papilio polyxenes* Fabricius 4种昆虫的14个 P-450 cDNA 基因被克隆和命名，其中以家蝇 *Musca domestica* P-450基因研究的最为透彻[5~7]，但在国内仍未见有关昆虫 P-450基因水平研究的报道，本研究以家蝇 *M. domestica* Rutgers 抗性种群细胞色素 P-450 *CYP6A1* cDNA[8]序列为参考，为保证扩增片段包含编码区序列，人工合成两个低 G/C%含量（分别为25%与33%）的引物，以家蝇 *M. domestica vicina* Macquart 敏感种群总 cDNA 为模板，通过聚合酶链反应（PCR），获得1.5kb 左右的预期的对 P-450 cDNA 的特异性扩增产物，为进一步深入研究提供了条件。

---

* 现工作单位是北京市农林科学院植保环保研究所
1996-09-02收稿，1997-04-24收修改稿

1 材料和方法

1.1 实验材料

家蝇 *Musca domestica vicina* Macquart 为室内不接触任何杀虫剂条件下人工饲养。羽化后的雌成虫用0.2%苯巴比妥钠水溶液作饲用水诱导3 d，然后乙醚麻醉备用。

1.2 主要试剂及仪器

Oligo (dT) -纤维素为 Sigma 产品，cDNA 合成试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品，α-^{32}P-dCTP 为福瑞公司产品，RT-PCR 试剂盒为 Peking-Elmer 公司1993年产品，由哈佛医学院王辛中博士惠赠，PCR 引物由美国（北京）赛百盛公司合成，PCR 扩增仪为 Blocksystem Ampli（美国产品）。

1.3 实验方法

1.3.1 家蝇总 RNA 提取：7 g 左右雌成虫经诱导处理，液氮冷冻，迅速用 Waring-blender 高速粉碎，在乳钵中研成粉末，按改进的异硫氰酸胍法 (AGPC)[9]提取总 RNA，通过电泳及紫外分析检测总 RNA 的质量和浓度。

1.3.2 mRNA 的分离：将总 RNA 样品经 Oligo (dT) -纤维素柱亲合层析，连接紫外检测仪收集 mRNA，操作参见[10~11]；将收集的 mRNA 经乙醇沉淀、抽干、溶于灭菌双蒸水中，用甲醛-甲酰胺凝胶电泳及紫外分光光度计测定OD_{260}/OD_{280}值来检测 mRNA 的质量和浓度。

1.3.3 cDNA 的合成：参照 Boehringer Mannheim 公司 cDNA 合成产品说明书，以 mRNA 为模板，以 Oligo (dT_{15}) 为引物在 AMV 反转录酶作用下合成 cDNA 第一链；再加入 *E. coli* RNaseH 和 *E. coli* DNA 聚合酶 I，在这一步中，由 RNAaseH 除 mRNA 模板并合成 cDNA 第二链；由此得到双链 cDNA。同时，在 cDNA 合成过程中加入放射性 α-^{32}P-dCTP，使 cDNA 的合成质量能经放射性自显影图予以证实。

1.3.4 PCR 扩增：(1) PCR 引物设计与合成：以 Feyereisen (1989) 等[8]发表的家蝇 *M. domestica* Rutgers 抗性种群 P-450 *CYP6A1* cDNA 序列为参考，为了保证预期的 PCR 产物包含 P-450蛋白的编码区，我们参照 Roehrdanz[12]的经验大胆设计了两个低 G/C%含量的 PCR 引物。

上游引物 Primer 1序列为：5′-ATTATGGATTTCGGTTCATTTC-3′ 22碱基 G/C%=33；下游引物 Primer 2序列为：5′-CCTTCGATTTATTTAATTTTCTTTCTTATAGC-3′ 32碱基 G/C%=25。引物采用 β-乙氰磷酰胺法合成，经 HPLC 纯化。经检查，两引物不互补，不形成链内二级结构。

(2) PCR 扩增反应：25 μL 反应体积中含：2.0 mmol/L $MgCl_2$、8 mmol/L Tris-HCl pH8.3、80 mmol/L KCl、0.6 mmol/L EGTA、0.2 mmol/L dNTP、Primer1 0.6 μg、Primer2 0.7 μg 和2.5U RT-PCR 试剂盒中 rTth taq 聚合酶。

反应循环：第1个循环，94℃ 2 min；第2～29个循环，94℃ 1 min、50℃ 2 min、72℃ 3 min；第30个循环，72℃ 7 min。反应结束后，取10 μL 反应混合物用于1.4%琼脂糖凝胶电泳，检查有无特异性扩增产物。

2　结果

2.1　Oligo(dT)-纤维素亲合层析结果

总 RNA 经 Oligo（dT）-纤维素亲合层析，洗脱图谱出现三个峰。第一峰为不含 polyA 的 RNA 和小分子 tRNA，第二峰为第一次没有洗脱完全而残留的 rRNA 以及其它结合不牢固的 RNA，第三峰为结合牢固的 mRNA，这是本实验所要收集的成分。所得 mRNA 经紫外分光光度计检测，其 $OD_{260}/OD_{280}=1.69$（图1）。

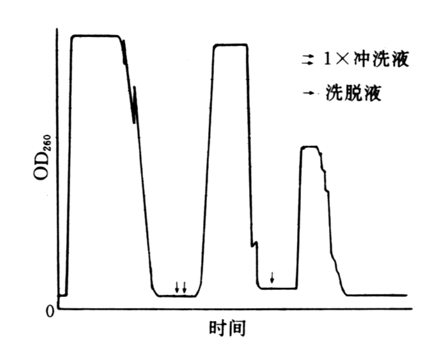


图1　家蝇总 RNA 的 Oligo(dT)-纤维素亲和层析图谱

2.2　cDNA 合成结果

cDNA 合成结果经放射性自显影证实，cDNA 主要浓集于4.3kb～0.5kb 之中（图2），而参考基因 *CYP6A1* cDNA 的开放阅读框（ORF）为1 530个核苷酸；由此可知，预期的 cDNA 长度应也属于此范围，故合成的总 cDNA 质量是符合要求的。

2.3　PCR 扩增结果

由 PCR 引物设计，预期产物长度为1 515个核苷酸对；从扩增结果（图3）来看，本实验获得了长度为1.5kb 左右的特异性扩增产物，而且条带清晰，没有其它非特异带扩增；说明 PCR 扩增 P-450 cDNA 的效果是理想的。

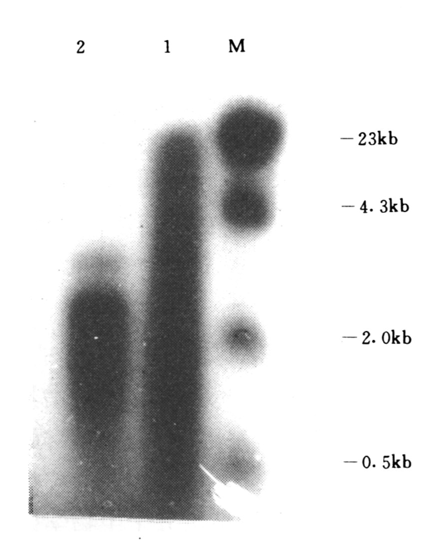


图2　cDNA 合成的放射性自显影图
M 道：λDNA *Hind* Ⅲ 放射性 marker；
1道：cDNA 第一链；2道：cDNA 第二链

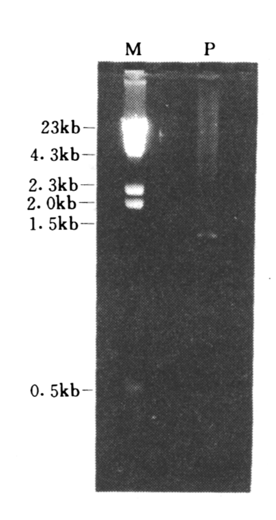


图3　PCR 扩增结果
M 道：λDNA *Hind* Ⅲ marker；
P 道：PCR 产物

3 讨论

许多研究[13]证实苯巴比妥对P-450具诱导作用，特别能加快P-450基因超家族（superfamily）中第6家族（CYP6）的转录，使蛋白表达量增高[14~15]。本实验扩增的参考基因*CYP6A*1 cDNA为P-450第6家族成员，为了提高目的P-450 mRNA占总mRNA的丰度，采用苯巴比妥钠溶液诱导，此举可能使以cDNA为模板的PCR扩增反应易于进行。

常规的PCR反应设计中，对引物中G/C%含量有较为严格的要求，一般为保证扩增的特异性，G/C%含量要求在45%～50%以上，G/C%含量过低，则必需降低退火温度，从而使非特异扩增条带增多[16~17]。但本实验为了获得P-450 cDNA全编码区的扩增，故PCR引物设计时G/C%含量偏低（仅为33%和25%）。在目前国内有关使用PCR技术的报道中，尚未发现用低G/C%含量引物作长片段基因扩增。本实验借鉴Roehrdanz[12]（1993）使用低G/C%含量（低至24%）引物获得1.6kb左右的昆虫线粒体DNA片段特异性扩增的经验，通过降低PCR反应过程中的退火温度和其它扩增条件，最后，我们在50℃退火温度、[Mg^{2+}]＝2.0 mmol/L和RT-PCR反应Buffer环境条件下，成功地扩增了长度约为1.5kb左右的目的片段；而且特异性好，无其它非特异性条带。说明对于低G/C%含量引物，通过改进扩增条件仍可能获得理想的扩增效果。

P-450基因具多型性，目前已从家蝇*M. domestica*中克隆了8个cDNA，均属于P-450的CYP6家族[6~8]。P-450基因在同类昆虫的不同种群中也广泛地存在遗传多态性。例如，来自家蝇Rutgers抗性种群、aabys敏感种群、sbo敏感种群的同一*CYP6A*1基因编码的P-450蛋白亦有差异，两两之间的氨基酸同源性均为98%，但氨基酸不是出现在P-450的催化活性区域[18]。Tomital等[19]（1995）较详细地研究了家蝇*M. domestica* LPR（抗性）、Rutgers（抗性）、aabys（敏感）、CS（敏感）及ISK（敏感）五个种群之间P-450 *CYP6D*1基因的遗传多态性。研究表明：*CYP6D*1 cDNA在此家蝇五个不同种群中，开放阅读框（ORF）核苷酸序列同源性介于96.71%～99.10%，编码P-450的蛋白同源性介于98.06%～99.81%；并且氨基酸差异还出现在P-450催化活性区。由此可知，同一P-450在家蝇的不同种群体内所起的催化活性作用可能也不相同。本实验PCR引物设计的依据正是基于P-450的遗传多态性和多型性，被扩增的条带中可能包含了不同P-450 cDNA，仍需进一步的研究。

分子生物学技术的日益完善极大地推进了对生命现象的本质在分子水平的研究。近年来，昆虫分子生物学研究进展也十分惊人，发达国家已十分重视对害虫防治具有潜力的前沿课题，纷纷把生物高技术融入害虫防治研究计划。我国在这方面的研究尚刚起步，而且，由于日益严重的害虫抗药性给农业生产造成了极大损失，化学农药的广泛使用又加重了环境污染和对生态系统的破坏；因而，在我国深入开展昆虫分子生物学研究，积极开辟抗性治理新途径，合理利用昆虫抗药性基因是十分必要和迫切的。

致谢 中国农业大学生物学院寿思明、崔振中二位博士对本实验给予了帮助，在此一并致谢。

参 考 文 献

1 Gonzalez F J *et al*. The molecular biology of cytochrome P-450s. Pharmacol. Rev., 1988, 40: 243～288

2 Gonzalez F J *et al*. cDNA-expressed human cytochrome P-450s; a new age of molecular toxicology and human risk assessment. Mut. Res., 1991, 247: 113～127

3 Hodgson E. Microsomal mono-oxygenases. In: Kerkut G A, Gilbert L I eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Physiology, Oxford: Pergamon Press, 1985, 11: 225～321

4 Oppenoorth F G. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In: Kerkut G A, Gilbert L I eds, Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford: Pergamon Press, 1985, 12: 731～774

5 Nelson D R *et al*. The P-450 superfamily: Updated on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. DNA Cell Biol., 1993, 12 (1): 1～51

6 Cohen M B *et al*. A cluster of cytochrome P-450 genes of the CYP6 family in the house fly. DNA Cell Biol., 1995, 14 (1): 73～82

7 Tomital T *et al*. cDNA and deduced protein sequence of CYP6D1: The putative gene for a cytochrome P-450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. Insect Biochem. Molec. Biol., 1995, 25 (2): 275～283

8 Feyereisen R *et al*. Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P-450 from an insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica*. Proc. Natl. Acad. Sic. USA, 1989, 86: 1 465～1 469

9 Chomczynski P *et al*. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 1987, 162: 156～159

10 L G 戴维斯等. 分子生物学基本实验方法. 张钰等译. 上海：复旦大学出版社，1989

11 Sambrook J *et al*. Molecular Cloning, A Laborotory Manual, 2nd. Cold Spring Laboratory Press, 1989

12 Roehrdanz R L. An improved primer for PCR amplification of mitochondrial DNA in a variety of insect species. Insect Mol. Biol., 1993, 2 (2): 89～91

13 Gonzalez F J *et al*. Evolution of the P-450 gene superfamily: animal-plant warfare molecular driver and human genetics difference in drug oxidation. Trend in Genetics, 1990, 6 (6): 182～186

14 Nebert D W *et al*. Evolution of the cytochrome P-450 genes. Xenobiotica, 1989, 19: 1 149～1 160

15 Susanns S T Lee *et al*. In vitro induction of microsomal cytochrome P-450 monooxygenase by phenobarbital in fat bodies of adult house fly, *Musca domestica* L.. Insect Biochem. Molec. Biol., 1992, 22 (7): 681～698

16 朱 平主编. PCR基因扩增实验操作手册. 北京：中国科学技术出版社，1993

17 Maria R P *et al*. PCR amplification of long DNA fragments. Nucleic Acids Research, 1992, 20 (3): 623

18 Cohen M B *et al*. Structure and chromosomal localization of CYP6A1, a cytochrome P-450-encoding gene from the house fly. Gene, 1994, 146: 267～272

19 Tomital T *et al*. Molecular mechanisms involved inincreased expression of a cytochrome P-450 responsible for pyrethroid resistance in the housefly, *Musca domestica*. Insect Mol. Biol., 1995, 4 (3): 135～140

AMPLIFICATION OF HOUSEFLY P-450 cDNA BY PCR DIRECTED BY A PAIR OF LOW G/C % CONTENT PRIMERS

Kang Qiaohua Chen Nianchun
(Department of Applied Agrochemistry, China Agricultural University, Beijing 100094)
Zhou Shunwu Qi Shunzhang
(College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract Based on multiplicity and genetic polymorphism of P-450 genes, total mRNA was isolated through oligo (dT)-cellulose column from total RNAs of an insecticide-susceptible strain of the housefly, *Musca domestica vicina* Macquart treated with sodium phenobarbital in the drinking water. Double-stranded cDNA were synthesized by reverse-transcription and used as template for polymerase chain reaction (PCR). The 1.5kb long anticipated DNA fragment coding for P-450 protein was amplified by PCR, using a pair of low G/C% content primers designed according to *CYP6A1* cDNA gene.

Key words housefly, cytochrome P-450, cDNA, PCR, genetic polymorphism